

Aus der I. Medizinischen Abteilung des Städtischen
Auguste-Viktoria-Krankenhauses, Berlin-Schöneberg
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Karl-Heinz Pfeffer

Wirkung synthetischer Steroide auf die
Nebennierenrindenfunktion, gemessen am
17-OHCS-Gehalt des Plasmas.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rutsch, Manfred
aus Königsberg i. Pr.

1963

Aus der I. Medizinischen Abteilung des Städtischen
Auguste - Viktoria - Krankenhauses, Berlin - Schöneberg

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Karl-Heinz Pfeffer

Wirkung synthetischer Steroide auf die Nebennieren-
rindenfunktion, gemessen am 17 - OHCS - Gehalt des Plasmas.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

R u t s c h, Manfred

aus Königsberg i.Pr.

Dekan: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t
Referent: Professor Dr. med. Karl-Heinz P f e f f e r
Korreferent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 4. Februar 1963

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite	1
Versuchsanordnung (Methodik)	"	9
Methode der 17 - OHCS - Bestimmung im Plasma ..	"	11
Ergebnisse	"	13
Diskussion der Ergebnisse	"	14
Literaturverzeichnis	"	17
Anhang (Tabellen, Abbildungen)	"	26

Die endokrinen Korrelationen unterliegen einem genau definierbaren Regulationsvorgang, von dem die Hormonproduktion abhängt. Die Sekretionsrate des Hypophysenvorderlappens (HVL) bestimmt die Höhe der Hormonbildung in den abhängigen Organen. Umgekehrt wird die Aktivität des HVL von der Spiegelbildung des peripher erzeugten Hormons im fördernden oder hemmenden Sinne beeinflusst. Dieser Funktionsablauf betrifft Schilddrüsen-, Gonaden- und Nebennierenrinden (NNR)-Hormon in gleicher Weise. Es steht außer Frage, daß darüber hinaus die angegebenen Systeme noch untereinander in Wechselbeziehung stehen können.

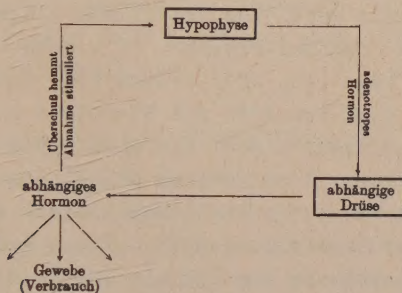


Abbildung aus Leuthardt, F., Lehrbuch der physiologischen Chemie, 13. Auflage, Berlin 1957.

Die Wechselwirkung zwischen den tropen Hormonen des HVL und dem peripheren Endokrinium soll in den folgenden Ausführungen im Bereich des HVL - NNR - Systems erläutert werden. Im Anschluß an diese folgen eigene Untersuchungen, die weitere Beweise für das feine und genau abgestufte Regulationsvermögen erbringen sollen.

Vom Normalen abweichende Reaktionsweisen kommen bei Unter- und Überfunktionszuständen von HVL und NNR vor. Es bestehen demnach vier grundsätzliche Möglichkeiten einer Korrelationsstörung.

1.) Das Reglerprinzip bei Unterfunktion der Hypophyse.

Unterfunktion der adrenocorticotropen Partialfunktion des HVL bedeutet Fortfall seines tropen Hormons mit konsekutiver Unterfunktion der NNR, die zunehmend atrophisch wird. Tierexperimentell hat man Kaninchen-, Ratten- und Mäusefoeten durch Dekapitation hypophysektomiert oder deren Hypophysenanlage durch Bestrahlung zerstört (10, 26, 46). Darauf trat in allen Fällen NNR - Atrophie ein, die aber durch ACTH verhindert werden konnte (10, 27). Eine andere Methode, mit der sich eine HVL - Unterfunktion erreichen läßt, beruht auf der Gabe corticotropen Hormons, das bei Ratten und Kaninchen zur NNR - Hypertrophie führt (28, 56). Mit der Hypertrophie geht eine Aktivitätssteigerung einher, die sich an einem erhöhten Plasma - 17 - OHCS - Spiegel am Menschen zeigen läßt (45, 49). Kracht (33) sah nach täglicher kombinierter Gabe von ACTH und Steroiden im Tierversuch eine hochaufgetriebene Rinde, die nach Applikationsstop in ihrem Aktivitätsgrad allmählich abfiel, um schließlich sogar subnormale Werte zu erreichen. Dieses Ergebnis wird wie folgt erklärt: Zusätzliche ACTH - Gaben neben der Steroidmedikation blockieren den HVL via NNR in doppeltem Sinne. Darüber hinaus sind sie in der Lage, das Wiedereinsetzen der endogenen ACTH - Sekretion nach Beendigung der Steroidzufuhr abzuschwächen.

2.) Das Reglerprinzip bei Überfunktion des HVL.

Als Ursache dieser Dysfunktion wirken hypophysäre basophile Adenome wie auch Schäden im Hypothalamus, die eine erhöhte ACTH - Sekretion erzeugen (11, 22). Der adrenotropen Überfunktion kommt im Gegensatz zur somatotropen, deren Krankheitsbild als Akromegalie bezeichnet wird, nur eine indirekte Wirkung über die NNR zu. Die verstärkte Stimulation der NNR findet anatomisch ihren Ausdruck in einem faszikulären Umbau mit Kernvergrößerung und weiter Kernlagerung als zusätzlichen Charakteristika (32, 33). Im Plasma erhöhten sich in solchen Fällen die 17 - OHCS, die die beim

endokrin Gesunden zwischen 3 γ bis 23 γ liegenden Werte pro 100 ml weit übertrafen (8, 9, 14, 41, 49). Entsprechend wurden auch die Steroide vermehrt im Harn ausgeschieden (44).

Diese Befunde gehören zu dem von Cushing beschriebenen und auch nach ihm benannten Krankheitsbild. Das Wesen der Erkrankung ist also eine Regulationsstörung zwischen ACTH - und entsprechender Cortisolbildung, durch die die Aktivität des HVL auf ein höheres Niveau des Cortisolspiegels eingestellt wird. Daß das Reglersystem besteht, beweist der auf HVL - Hemmung beruhende Abfall der 17 - OHCS im Plasma, wie derjenige der 17 - Ketosteroide im Urin auf Steroidmedikation (sogenannter Hemmtest) (12, 25, 44) und der Anstieg der 17 - OHCS im Plasma nach ACTH - Applikation (Stimulationstest) (25, 49).

3.) Das Reglerprinzip bei Überfunktion der NNR.

Die primäre Überfunktion der NNR beruht auf hormonell aktiven, d.h. ausdifferenzierten Rindentumoren, insbesondere Carcinomen, die ihre Corticosteroide unabhängig vom adrenocorticotropen Hormon produzieren. So fanden sich nach ACTH - Applikation keine signifikanten Änderungen der Plasma - 17 - OHCS bei einem Patienten mit Cushing Syndrom, das durch ein Carcinom ausgelöst worden war (49). Auch Gabe des synthetischen Steroids Dexamethason bewirkte nur eine geringe Senkung der Urin - 17 - CS und Urin - 17 - OHCS beim Cushing Syndrom mit durch Operation gesicherter, tumorös veränderter NNR, wie Decourt et al. zeigen konnten (12). Das bedeutet, daß der NNR - Tumor eine eigenständige, unbeeinflussbare Hormonsekretion unterhielt. In prinzipiell gleicher Weise wie die autonome Überfunktion von Rindengewebe wirkt sich die fortlaufende Gabe synthetischer Steroide aus. Qualitativ wirken diese wie das Cortisol hemmend auf die ACTH - Sekretion des HVL, zeigen aber starke quantitative Unterschiede. Sichtbar wird ihre Wirkung an der NNR, die regressiv transformiert wird (33). Längere Behandlung mit hohen Dosen hat jedoch auch zu zytomorpho-

logischen Veränderungen im HVL geführt (21, 30, 37, 39).

4.) Das Reglerprinzip bei Unterfunktion der NNR.

Schon 1936 konnten Ingle und Kendall nachweisen, daß Corticosteroidmedikation zur NNR - Atrophie führt, pathologisch-anatomisch als regressive Transformation bezeichnet (24). Erst später, nach Entwicklung des Cortisons, wurde beobachtet, daß dieser Effekt auf das Endokrinium auch beim Menschen auftritt. Neben einer Schrumpfung der Zona fasciculata als funktionstragender Schicht sind Kerngrößenverkleinerungen, Zusammenballung der Parenchymzellkerne - die Kernzahl ist deshalb in bezug auf die Flächeneinheit vermehrt - meßbarer Ausdruck der Regression (31, 33, 34).

Setzt man eine Steroidtherapie ab, so ist als Unterfunktionszustand eine hyposteroidämische Phase zu erkennen, die als Zündung für das Wiedereinsetzen der ACTH - Sekretion gilt (20, 33). Wird das Absetzen einer Steroidtherapie mit halbseitiger Adrenalektomie kombiniert, so folgt eine überschießende ACTH - Mehrsekretion von längerer Dauer (33). Andererseits ist es bei gleichzeitiger Gabe von ACTH und Steroiden in bestimmten Relationen möglich, gewisse Steroideffekte aufzuheben (3, 17, 36, 54). Beidseitige Adrenalektomie führte im Tierversuch neben dem Verschwinden der Rindensteroiden zu einer Konzentrationserhöhung des ACTH im Blut, die z.B. bei Hunden und Ratten den 30 -fachen Wert erreichte (19).

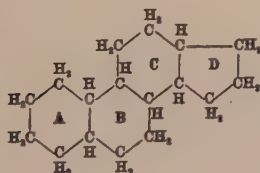
Ähnliche Feststellungen konnten bei der nach dem englischen Arzt Addison benannten Krankheit, die auf einer mehr oder weniger weitgehenden Zerstörung des Rindengewebes (meist durch tuberkulöse Prozesse) beruht, getroffen werden. Neben niedrigsten Corticoidmengen in Harn und Plasma fand sich ein meßbarer, d.h. erhöhter ACTH - Spiegel im Blute (43, 44, 49). In den Fällen mit klinisch deutlichem Morbus Addison, bei denen ACTH - Gabe eine NNR - Reaktion bewirkt, mußte auf noch funktionsfähiges Rindengewebe geschlossen werden (19, 49).

Eine andere Form der NNR - Unterfunktion stellt das adrenogenitale Syndrom dar. Man weiß, daß in diesen Fällen die Cortisolproduktion gestört ist und damit die ACTH - Bremse fortfällt. Der erhöhte Blut - ACTH - Spiegel bewirkt eine Stimulierung der Androgensynthese. Die Androgene sind aber nicht oder nur unzureichend in der Lage, die hypophysäre ACTH - Sekretion zu hemmen. Zufuhr von Cortisol schafft hier Abhilfe. Die Androgenbildung wird infolge der nun gebremsten HVL - Funktion gesenkt (44).

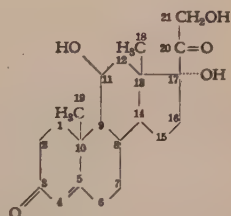
Bisher fehlt aber noch eine verbindliche Beobachtung, in welcher Weise die im folgenden aufgeführten, durch ihre Stoffwechselfunktionen unterschiedlich wirkenden synthetischen Steroide beim Menschen in die Regulation des HVL - NNR - Systems einzugreifen vermögen. Die wesentlichen Substanzen, auf die sich die eigenen später aufgeführten Untersuchungen beziehen, seien orientierend beschrieben.

Ursprünglich wurde angenommen, daß das Cortison das natürliche, sich am stärksten glucocorticotrop auswirkende Hormon sei. Das erwies sich als falsch, da diese Rolle dem Cortisol zufiel. Seine Grundstruktur entspricht der des Kohlenwasserstoffs Cyclopentanoperhydrophenantren. Hinzu kommen Molekülveränderungen, die auch allen anderen Hydrocortisonderivaten gemeinsam sind.

Chemische Formel:



Cyclopentanoperhydro-
phenantren



Cortisol
(Hydrocortison)

Dazu gehören der in C 3 angelagerte Sauerstoff, die Doppelbindung zwischen C 4 - C 5 und die Seitenkette in C 17.

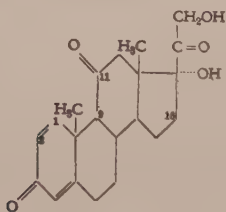
Für das Cortisol charakteristisch sind die in C 11 und C 17

des Steroidmoleküls angelagerten Hydroxylgruppen. Die Effekte des Cortisols differieren kaum von denen des Cortisons, wie aus der Tabelle 1 (s. Anhang), die einer Arbeit von Beiglböck entnommen wurde, ersichtlich ist (2). Diese bringt eine Darstellung der wichtigsten bisher erarbeiteten Eigenschaften verschiedener Steroide und gestattet, diese untereinander zu vergleichen. Sämtliche Angaben beziehen sich dabei auf das Cortison, dessen Effekte gleich 1 gesetzt wurden.

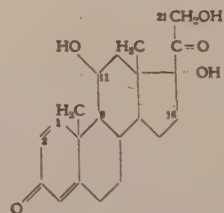
Die sich bei der Therapie entzündlicher Erkrankungen störend bemerkbar machenden mineralcorticotropen Eigenschaften veranlaßten ausgedehnte Untersuchungen an synthetischen Cortisolderivaten mit dem Zweck, für die Klinik besser geeignete Abkömmlinge zu finden. Besonders wertvoll erwiesen sich die Anlagerung eines Halogens in C 9, Schaffung einer zweiten Doppelbindung zwischen C 1 - C 2 in Ring A des Steroidgerüsts, Einführung einer Methylgruppe in C 6 bzw. C 16 und einer Hydroxylgruppe in C 16 entweder einzeln oder kombiniert.

Der mit einer zusätzlichen Doppelbindung (zwischen C 1 und C 2) versehene Cortisonabkömmling wird als Prednison, das Cortisolderivat als Prednisolon bezeichnet.

Chemische Formel:



Prednison



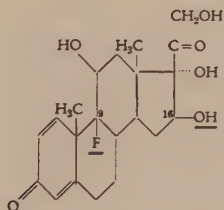
Prednisolon

Die Ergebnisse klinischer Studien, aufgetragen in der Tabelle von Beiglböck, zeigen wie ähnlich sich die Stoffwechselfunktionen dieser Verbindungen verhalten.

Die mineralcorticotropen Eigenschaften ändern sich. Die Natriumretention fällt weg, die Kaliumverluste sind niedrig. Ebenfalls tritt eine Wandlung der glucocorticotropen Auswirkungen ein. Die antiphlogistischen und die den HVL bremsenden Eigenschaften dieser Substanzen erhöhen sich um das 3 bis 5 -fache im Vergleich zum Cortison und Cortisol.

Durch die Einführung eines Halogens in C 9 α - Stellung des Corticoidrings wird die glucocorticotrope Wirkung bei der Ratte, die antirheumatische beim Menschen um das 10 -fache verstärkt. Gleichzeitig erhöht sich der unerwünschte Natriumretentionseffekt des 9 α Fluorcortisols gegenüber Cortisol und Cortison beträchtlich und läßt daher eine therapeutische Verwendung nur in begrenztem Umfang zu. Fluorprednison und Fluorprednisolon erwiesen sich aus den gleichen Gründen als wenig brauchbare Verbindungen.

Chemische Formel:



Triamcinolon

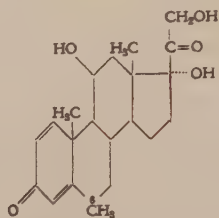
(9 α -Fluor - 16 - OH - Prednisolon)

Durch eine zusätzliche 16 α - Hydroxylierung, wie im Triamcinolon, wird nicht nur die Salzretention, sondern auch die glucocorticoide Aktivität des 9 α - Fluorcortisols, Prednisons und Prednisolons auf Werte gesenkt, die denen des Prednisons und Prednisolons entsprechen. Das trifft ebenso auf die Drosselung der ACTH - Sekretion wie auch auf die relativ begrenzte antirheumatische Wirksamkeit dieser Steroide zu.

Die entzündungshemmende Potenz und Hemmung der ACTH - Sekretion einer im Jahre 1955 entwickelten Substanz, 6 α Me-

thylprednisolon benannt, sind in Untersuchungen an Menschen dem zugrunde liegenden Prednisolon sehr ähnlich. Beim Vergleich auf Milligramm - Basis konnte bei der Prüfung der Entzündungshemmung ein Zahlenverhältnis von 10,9 : 8,2 mg beobachtet werden (42).

Chemische Formel:

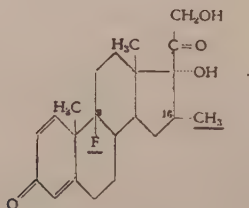


6 - Methylprednisolon

Im Tierversuch ergaben sich auf einigen Gebieten etwas höhere Vergleichswerte. So waren die antientzündlichen Effekte um das 6 -fache, die des Glycogenanbaus um das 10 -fache gegenüber denen des Cortisols gesteigert.

Einen Wechsel wichtiger physiologischer Eigenschaften brachte die Einführung eines Radikals, einer Methylgruppe, in C 16 des in C 9 fluorierten Prednisolons. Dieses 16 α Methyl - 9 - Fluor - Cortisol wird als Dexamethason bezeichnet.

Chemische Formel:



Dexamethason

Die glucocorticotrope Funktion wurde durch diese Form der

Substitution in bemerkenswerter Weise bei Tier und Mensch verändert. So stieg die antiphlogistische Wirkung gegenüber dem Cortisol um das 190 -fache bei zunehmender ACTH - Hemmung. Die Angaben über diese Wirkungsintensität schwanken um das 8 bis 30 -fache im Vergleich zum Prednison bzw. Prednisolon (5, 48, 51, 55).

Auf dem Gebiete des Salzwasserhaushaltes soll eine kurzfristige schwache Natrium - und Kalium - Diurese eintreten (38).

Es war das Ziel der eigenen Untersuchung, im Anschluß an eine weitere Arbeit von Pfeffer und Bublitx (43),

1.) den Grad der endogenen ACTH - Produktion unter der Einwirkung der o.a. synthetischen Steroide (Cortisolabkömmlinge) zu prüfen. Diese Substanzen besitzen, wie erwähnt, eine sehr unterschiedliche Intensität vor allem in Hinblick auf ihre antiphlogistischen und proteinkatabolischen Effekte. Besonders interessant ist, ob die Intensität der Stoffwechselwirkung dem ACTH - Hemmeffekt entspricht.

2.) In früheren Arbeiten wurde gefunden, daß unter Anwendung von Prednison zwar die endogene ACTH - Produktion wirkungsvoll gehemmt werden kann, die Ansprechbarkeit der geblockten NNR - Funktion durch exogenes ACTH aber nachweisbar ist.

In diesem Zusammenhang ist interessant festzustellen, ob auch andere synthetische Steroide mit erheblicher Bremswirkung auf die endogene ACTH - Bildung ebenfalls die NNR - Funktion, gemessen an der Ansprechbarkeit auf exogenes ACTH, nachhaltig zu drosseln vermögen.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Methodik:

Die Untersuchungen erfolgten an insgesamt 15 männlichen Personen im Alter von 19 - 63 Jahren durch Bestimmung der freien 17 - Hydroxycorticosteroide (17 - OHCS) im Plasma (Tab. 2, s. Anhang).

Die Versuchsanordnung war folgende:

Die Untersuchung jedes Patienten erstreckte sich auf 7 Tage.

1. Tag = ACTH - Vortest

20 ml Blut wurden für die Leerwertbestimmung der 17 - OHCS im Blutplasma entnommen, gleich im Anschluß daran 25 IE ACTH ¹ iv. injiziert. Die Injektionszeit betrug etwa 15 ". Nach genau 60 ' erfolgte eine zweite Abnahme einer gleichen Blutmenge.

2. - 5 Tag

An diesen Tagen wurden je 40 mg pro Person und Tag der angewendeten Steroide verabreicht. Die 15 Untersuchten wurden in 3 Gruppen zu je 5 Probanden zusammengefaßt. Davon erhielt die

1. Gruppe 40 mg/Tag/Person Cortisol ²
2. " 40 mg/Tag/Person 6 - Methylprednisolon ³
3. " 40 mg/Tag/Person 16 - Methyl - 9 - Fluorprednisolon ⁴

Gleichzeitig wurden an diesen Tagen je einmal Blut zur Bestimmung der 17 - OHCS entnommen.

7. Tag = ACTH - Nachtest

Es wurde genau so wie am ersten Tage vorgegangen.

Bei den Blutentnahmen, immer zur gleichen Tageszeit am Nüchternen durchgeführt, tropfte das Blut durch eine dicke Kanüle in einen entsprechend großen Erlenmeyerkolben. Dieser war, um eine Gerinnung zu verhüten, mit 1 - 2 Tropfen eines biologischen Anticoagulans (Heparin) versehen. Sofort nach Entnahme wurde das Blut etwa 15 ' lang bei 2800 Umdrehungen zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und im Kühlschrank zur Verarbeitung nicht länger als 24 h aufbewahrt.

- 1) Corticotrophin ^R Organon
- 2) Ficortril ^R

- 3) Urbason ^R Hoechst
- 4) Dexamethason ^R
Fortecortin ^R

Die Verarbeitung erfolgte nach der Methode zur Bestimmung der C_{17} Hydroxycorticosteroide ($C_{17,21}$ - Dihydroxy - Kosterioide) im Blutplasma nach Nelson - Samuels (13, 40), modifiziert von Witzel und Pfeffer (47).

Benötigte Reagenzien:

- 1) Chloroform (für Chromatographie), unmittelbar vor Gebrauch über K_2CO_3 destilliert. (Haltbarkeit etwa 4 Stunden).
- 2) Äther p.a.
- 3) Äthanol abs. aldehydfrei durch Destillation über 2,4 - Dinitrophenylhydrazin.
- 4) Hexan p.a.
- 5) H_2SO_4 p.a., 62 %ig.
- 6) Phenylhydrazinhydrochlorid, umkristallisiert aus Äthanol abs. (aldehydfrei) und getrocknet über $CaCl_2$.
- 7) Phenylhydrazinreagenz, hergestellt aus 10 ml 62 %iger H_2SO_4 (5) und 16 mg Phenylhydrazinhydrochlorid (6).
- 8) Florisil (Floridin Company, Warren, Pa), 8 Stunden ausgewaschen mit Äthanol abs. und 12 Stunden bei $120^\circ C$ getrocknet, durch Erhitzen auf 600° für 4 Stunden aktiviert.
- 9) Präparierte Glaswatte (mit Chloroform [1] ausgewaschen und anschließend bei Zimmertemperatur getrocknet).

Die Bestimmung selbst wird folgendermaßen durchgeführt:

10 ml des in oben beschriebener Weise vom Patienten gewonnenen und aufbewahrten Plasmas werden mit 40 ml aqua dest. verdünnt und 4 mal mit 20 ml einer Äther - Chloroformlösung (5 : 1) ausgeschüttelt und 4 Minuten zentrifugiert. Die Ätherchloroformextrakte werden jeweils abgesaugt und die 4 Proben vereinigt.

Die 80 ml Extrakte werden im Vakuum an der Wasserstrahlpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 45° eingengt; hierzu werden 100 ml - Kölbchen mit einer etwa 2 ml fas-

senden Delle im Boden benutzt. Der Rückstand wird in 15 ml 70 %igem Äthanol aufgenommen, quantitativ in einen Schütteltrichter überführt und zur Entfernung der Neutralfette 3 mal mit je 20 ml Hexan ausgeschüttelt. Das Hexan wird verworfen, der Alkohol im Kölbchen mit dem Luftstrom einer Wasserstrahlpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 50° vom Extrakt abgedampft. Der verbleibende Rückstand wird in etwa 5 ml Chloroform aufgenommen und ist fertig für den Durchlauf durch die Säule.

Die Säule besteht aus einem 11 cm langen Glasrohr mit Normalschliff (14,5 mm Länge, 11 mm Durchmesser). Unten ist ein Hahn angeschlossen, an den ein Heber aus Kapillarrohr angesetzt ist. Der Heber reicht an der Säule 8 cm hoch und verhindert eine Senkung des Flüssigkeitsspiegels unter diese Höhe. Auf der Säule sitzt ein Tropftrichter mit Graduierung für 50 ml.

Die Säule wird mindestens 4 Stunden vor Gebrauch vorbereitet, der Hahn mit Silikonhahnfett eingefettet, die Säule mit Glaswatte verstopft und mit Chloroform gefüllt. Danach schüttet man langsam Florisil in das Chloroform bis 1 cm unter die Heberbiegung. Kurz vor dem Gebrauch werden 25 ml Chloroform durchgegeben, darauf der in 5 ml Chloroform aufgenommene Rückstand quantitativ in den Tropftrichter auf der Säule überspült und die Tropfgeschwindigkeit des Durchlaufsystems auf 1 Tropfen pro Sekunde eingestellt.

Nach Durchlaufen der Substanz folgen:

- 1) 25 ml Chloroform
- 2) 35 ml Chloroform mit 5 % Methanol
- 3) 25 ml Chloroform mit 25 % Methanol

In einem Kölbchen wird nur die Lösung des 5 %igen und 25 %igen Methanol - Chloroformgemisches aufgefangen, alle anderen Fraktionen werden verworfen, da sie keine C₁₇ - Hydroxycorticosteroide enthalten.

Die Fraktion im Kölbchen wird an der Wasserstrahlpumpe bei einer Wasserbadtemperatur von 45° bis zur Trockenheit eingedampft, die Wandung des Kölbchens mit einer Kapillare 3 mal

mit Chloroform abgespült, wobei die Flüssigkeitsmenge nicht die Delle des Kölbchens übersteigen soll. Darauf wird erneut eingedampft. Der Rückstand wird in 0,4 ml Methanol gelöst und während der nächsten 10 Minuten öfter umgeschüttelt. 0,2 ml der Methanollösung werden in ein zweites Kölbchen abpipettiert und als Leerwert mit 0,3 ml 62 %iger H_2SO_4 versetzt, während als Hauptwert den übrigen 0,2 ml Methanollösung 0,3 ml der reagierenden Substanz (hergestellt wie unter Punkt 7 angegeben) zugesetzt werden. Beide Kölbchen werden sorgfältig umgeschüttelt und 20 Minuten in ein Wasserbad von 60° gestellt. Nach raschem Abkühlen unter der Wasserleitung wird die Extinktion der gelben Farbe des Hauptwertes gegen den Leerwert am Spektrometer gemessen. Hierzu füllt man je eine Mikroküvette mit dem Haupt- und Leerwert und mißt die Extinktion bei den Wellenlängen 370 m μ , 410 m μ und 450 m μ .

Der Absorptionsfaktor $E = E_{410 \text{ m}\mu} - \frac{E_{370 \text{ m}\mu} + E_{450 \text{ m}\mu}}{2}$

Aus einer Eichkurve entnimmt man die zu diesem Faktor gehörige Oxysteroidmenge als Oxysteroid in 5 ml Plasma, mit 20 multipliziert erhält man den Wert der Oxysteroidmenge in 100 ml Plasma.

Ergebnisse:

Der Steroidgehalt des Plasma verhält sich, wie die Abb. 1 zeigt, bei Zugabe aller synthetischen Substanzen gleichartig. Während der Zeit der Steroidzufuhr erniedrigt sich der 17 - OHCS - Gehalt im Plasma progressiv. Die Unterschiede im Kurvenverlauf der einzelnen Substanzen - Ausdruck ihrer unterschiedlichen Hemmwirkung auf die genuine ACTH - Produktion - wird bemerkenswerterweise bereits am ersten Tage nach Einnahme der Drogen erkennbar. Im Vergleich der einzelnen Steroide kommt dem Dexamethason^R und Urbason^R der nachhaltigste Einfluß auf den 17 - OHCS - Gehalt im Plasma zu, deren Wert vom dritten bzw. vierten Tage an in den mit der Methode nicht mehr meßbaren Bereich einschwanken. Dort verharrten sie bis zum Ende der Steroidmedikation. Ein deutlicher, aber weniger ausgeprägter Anstieg der 17 - OHCS wurde unter Ficortril^R beobachtet.

Der Anstieg der 17 - OHCS im Plasma nach Gabe von ACTH vor und nach Steroidmedikation wird in Abb. 2 dargestellt. Wie nicht anders zu erwarten, übertrafen die bei den Probanden vorgenommenen Vorteste den Ausgangswert um 200 bis 400 %. 60 Minuten nach intravenöser Injektion des ACTH zu diesem Zeitpunkt, ist mit einer annähernd maximalen Antwort der NNR zu rechnen (1, 4, 43).

Der 17 - OHCS - Spiegel im Plasma nach vorausgehender Steroidgabe während 5 Tagen stieg nach ACTH - Gabe prozentual viel höher an als in der Vorperiode unter den gleichen Bedingungen. Dabei ergab sich ein ungefähr gleich hoher Anstieg nach der ACTH - Gabe, unabhängig davon, ob vorher Cortisol, 6 α Methylprednisolon oder Dexamethason gegeben wurden.

D i s k u s s i o n d e r E r g e b n i s s e

Die erhaltenen Versuchsergebnisse bestätigen Arbeiten, die sich mit der Wirkung exogen zugeführten Cortisols und Derivaten auf die Funktion des NNR - HVL - Systems befassen (9, 12, 14, 15, 18, 20, 45, 49, 50). Die angewandten Steroide drosseln die Funktion der NNR bereits während 5 tägiger Medikation in verschiedenem Ausmaß, entsprechend den Angaben der Tabelle von Beiglböck (2).

In allen Fällen wird auf exogenes ACTH, in Prozent zum Ausgangswert gesehen, mit einer überaus großen Hormonabgabe durch die NNR geantwortet.

Es resultiert die Frage nach den Ursachen dieser Reaktion: Waren die benützten Steroide nicht in der Lage, die endogene ACTH - Produktion derart zu drosseln, daß die trophe Wirkung dieses Hormons fortfiel oder war trotz Ausfall der corticotropen Partialfunktion des HVL die Fähigkeit des adrenalen Organs noch vorhanden, seinerseits Hormon zu produzieren?

Studien über die Auswirkungen von Steroidpräparaten auf die Hypophyse und ihre Funktion sind insbesondere nach Langzeit - Therapie gemacht worden. Es konnte gezeigt werden, daß durch den Einfluß auf die Höhe der ACTH - Produktion Veränderungen in der Synthese der Steroidhormone eintreten müssen. Bei Ratte und Hund verminderte langdauernde Cortisongabe den hypophysären ACTH - Gehalt (16, 23, 29). In einigen Fällen wurde eine HVL - Insuffizienz manifest (6). Bei Unterbrechnung der physiologischen Cortisolproduktion durch eine dem Amphenon B verwandte Substanz (7) resultierte eine ACTH - Überproduktion, die beim Steroidbehandelten nicht auftrat.

Nachfolgende Behandlung mit exogenem ACTH ergab aber eine NNR - Reaktion.

Kyle et al. konnten eine HVL - Insuffizienz nach Senkung eines erhöhten Plasma - 17 - OHCS - Spiegels demonstrieren (6, 35). Durch Zufuhr von exogenem ACTH gelang es, den Zustand dieser Patienten zu normalisieren. Ähnlich verliefen Versuche, in denen die Hypophyse durch pyrogene Substanzen zu erhöhter ACTH - Ausscheidung veranlaßt wurde. Vorherige Cortisonapplikation minderte den Anstieg deutlich.

Diese von Sayers et al. im Tierversuch gefundenen Ergebnisse sind vergleichbar mit denen einer anderen Gruppe, die die Höhe der endogenen ACTH - Bildung nach Steroidbehandlung am Ascorbinsäuregehalt der NNR, ebenfalls im Tierversuch, bestimmte (50, 57, 58).

Pfeffer und Bublitz fanden gleichwertige Resultate an Menschen (45). Sie stellten fest, daß nach 10 tägiger Prednisongabe von 40 mg/Tag nur die Basiswerte der Plasma - 17 - OHCS, nicht aber die Reaktion auf injiziertes ACTH vermindert war. Ursache dafür war die erhaltene potentielle Fähigkeit der NNR, dieser Stimulation zu entsprechen, obgleich die corticotrope Partialfunktion weitgehendst ausgefallen war; denn künstliches Fieber führte

beim Steroidbehandelten zu geringerem Ansteigen der Plasmasteroide als beim Unbehandelten.

Die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Werte weisen in die gleiche Richtung.

So entsteht die Vorstellung, daß trotz gedrosselter hypophysärer ACTH - Produktion die Wirkungsweise dieses Hormons an der NNR erhalten bleibt. Diese verläuft nach den bisher erarbeiteten Tatsachen (52, 53) über das Enzym Cyclase, das eine Reaktionskette in Gang setzt mit Adenosin-3', 5' - Phosphat Anreicherung, Erhöhung der Phosphorylaseaktivität, Abspaltung von Glucose - 1 - Phosphat aus Glycogen. Durch Umlagerung entsteht Glucose - 6 - Phosphat, dieses wird dehydriert, Triphosphorpyridinnucleotid (TPN) dient dabei als Wasserstoffakzeptor.

Das so gebildete TPNH soll für den ACTH - Effekt entscheidend sein, da es als H - Donator und Coenzym für den Steroidaufbau notwendig ist.

Es wird auch angenommen, daß das ACTH durch Aktivierung von Enzymsystemen in gebundener Form im NNR - Gewebe enthaltene Grundverbindungen bereitstellt, die für die Steroidbildung erforderlich sind.

Die erörterten Punkte lassen den Schluß zu, daß die Restitution der auf adrenaler Atrophie beruhenden, therapeutisch bedingten Unterfunktion somit eine Frage der Neumbildung der corticotropen Eigenleistung wird.

Literaturverzeichnis

- 1) Bayliss, R.I.S., A.W. Steinbeck
The adrenal response to corticotrophin. Effect of ACTH on plasma adrenal steroid levels.
Brit. Med. J. (1954) I, 486.

- 2) Beiglböck, W.
Chemie und Pharmakologie der neuen Kortikosteroide
Wien. Med. Wschr. 109, 585 (1959).

- 3) Bierich, J.R., I. Kersten, S. Maruektad
Plasmacorticosteroids and Their Responsiveness to Corticotrophin After Longterm Therapy with Corticosteroids and Corticotrophin.
Acta Endocrinologica (Kbnv.) 31, 40 (1959).

- 4) Bliss, E.L., D.H. Nelson, L.T. Samuels
Effects of i.v. ACTH on blood levels of 17 - OH - corticosteroids and circulating leukocytes.
J. Clin. Endocrinol. a. Metab. 14, 423 (1954).

- 5) Bunim, J.J., R.L. Black, L. Lutwak, R.E. Peterson, G.D. Whedon
Studies on dexamethasone, a new synthetic steroid, in rheumatoid arthritis in a preliminary report.
Arth. and Rheum. 1, 313 (1958).

- 6) Carreon, G.C., J.J. Canary, L.H. Kyle
Adrenocortical function after longterm corticoid therapy.
Clin. Res. 7, 146 (1949).

- 7) Chart, J.J., H. Sheppard, M.J. Allen, W.L. Bencze,
R. Gaunt
New amphenone analogs as adrenocortical inhibitors.
Experientia 14, 151 (1958).

- 8) Christy, N.P., E.Z. Wallace, J.W. Jailer
The Effect of Intravenously - administered ACTH on
Plasma 17,21 - Dihydroxy - 20 - Ketosteroids in Nor-
mal Individuals and in Patients with Disorders of the
Adrenal Cortex.
J. Clin. Invest. 6, 899 (1955).

- 9) Christy, N.P., E.Z. Wallace, J.W. Jailer
Comparative effects of prednisone and of cortisone
in suppressing the response of the adrenal cortex
to exogenous adrenocorticotropin.
J. Clin. End. a. Metab. 16, 1059 (1956).

- 10) Cohen, A.
Poids des surrénales du foetus de rat décapité injecté
d'hydrocortisone ou de corticostimuline à divers stades
du développement.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 154, 1396 (1960).

- 11) Cushing, H.
The basophilic adenomas of the pituitary body and their
clinical manifestations (pituitary basophilism).
Bull. Johns Hopkins Hosp. 50, 137 (1932).
cit. nach (19).

- 12) Decourt, J., M.F. Jayle, J.P. Michard, P. Mauvais
Utilisation de la dexaméthasone dans les épreuves
de freinage de la cortico - surrénale.
Sem. Hop. 36, 6 : 351 (1960).

- 13) Eik - Nes, K., D.H. Nelson, L.T. Samuels
 Determination of 17,21 - Hydroxycorticosteroids in Plasma.
 J. Clin. Endocrinol. a. Metab 13, 1280 (1953).

- 14) Eik - Nes, K., A. Sandberg, D.H. Nelson, F.H. Tyler, L.T. Samuels
 Changes in Plasma Levels of 17 - Hydroxycorticosteroids during the Intravenous Administration of ACTH. I A Test of Adrenocortical Capacity in the Human.
 J. Clin. Invest, 33, 1502 (1954).

- 15) Eik - Nes, K., A.A. Sandberg, C.J. Wigeon, F.H. Tyler, L.T. Samuels
 Changes in plasma levels of 17 - hydroxycorticosteroids during the intravenous administration of ACTH. II Response under various clinical conditions.
 J. Clin. Endocrinol. a. Metab. 15,13 (1955).

- 16) Farrell, G.L. G. Laqueur
 Reduction of Pituitary Content of ACTH by Cortisone.
 Endocrinology 56, 471 (1955).

- 17) Gass, G.H., E.J. Umberger
 Effect of ACTH on the weight of rat adrenals depressed with hydrocortisonacetate.
 Fed. Proc. 18, 1/I : 392 (1959).

- 18) Geller, J., A.S. Alvarez, A. Gutman, A. de Freitas, J.L. Gabrilove, L.J. Soffer
 Effect of prednisone on adrenal responsiveness to corticotropin in normal subjects and in patients with treated and untreated Cushing's syndrome.
 J. Clin., Endocrinol. a. Metab. 18, 409 (1958).

- 19) Gemzell, C., D.C. van Dyke, C.A. Tobias, H.M. Evans
Increase in the Formation and Secretion of ACTH
Following Adrenalectomy.
Endocrinology 49, 325 (1951).

- 20) Geyer, G.
Über das Verhalten der Nebennierenrindenfunktion nach
Therapie mit Δ^1 - Cortisonen.
Wien. klin. Wschr. 70, 477 (1958).

- 21) Golden, A., P.K. Bondy
Cytologic Changes in Rat Adenohypophysis Following
Administration of Adrenocorticotrophin or Cortisone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 252 (1952).

- 22) Heinbecker, P., M. Pfeiffenberger
Further Clinical and Experimental Studies on the
Pathogenesis of Cushing's Syndrome.
Am. J. Med. 9, 3 (1950).

- 23) Holub, D.A., J.I. Kitay, J.W. Jailer
Effect of exogenous adrenocorticotrophic hormone
(ACTH) upon pituitary ACTH concentration after
prolonged cortisone treatment and stress.
J. Clin. Invest. 38, 291 (1959).

- 24) a) Ingle, D.J., E.C. Kendall
Science 86, 245 (1937).
b) Ingle, D.J., G.M. Higgins, E.C. Kendall
Anatom. Records 71, 363 (1938)
cit. nach (27).

- 25) Jailer, J.W., D. Longson, N.P. Christy
Cushing's syndrome - an adrenal or pituitary disease.
J. Clin. End. a. Metab. 16, 1276 (1956).

- 26) Jost, A.
Influence de la décapitation sur le développement
du tractus génital et des surrénales de l'embryon
de Lapin.
C. R. Soc. Biol. 142, 273 (1948).
- 27) Jost, A.
La physiologie de l'hypophyse foetale.
Biol. médicale 40, 207 (1951).
- 28) Jost, A., R. Jacquot
Recherches sur les facteurs endocriniens de la charge
en glycogène du foie foetal chez de lapin (avec
des indications sur le glycogène placentaire).
Annales d'Endocrinologie 16, 849 (1955).
- 29) Kitay, J.I., D.A. Holub, J.W. Jailer
Hormonal regulation of pituitary adrenocorticotrophin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 165 (1958).
- 30) Klärner, P.
Veränderungen an Nebenniere und Hypophyse der Ratte
nach vielmonatiger Zufuhr von ACTH.
Beitr. path. Anat. Physiolog., Begr. von E. Ziegler
115, 488 (1955).
- 31) Kracht, J.
Sog. Rebound = Phänomen an der Nebennierenrinde nach
Zufuhr von Glucocorticoiden.
Endokrinologie 35, 5/6 : 290 (1958).
- 32) Kracht, J.
Restitution der corticoidbedingten Nebennierenrinden-
atrophie.
Die Naturwissenschaften 45, 3 : 61 (1958).

- 33) Kracht, J.
Morphokinese der Nebennierenrinde nach Anwendung von
Cortison und Cortisonderivaten.
Medizinische 106 (1959).
- 34) Kracht, J.
Auswirkungen intermittierender Corticoidgaben auf
die sekundäre Nebennierenrindenatrophie.
Endokrinologie 39, 1/2 : 80 (1960).
- 35) Kyle, L., R.J. Meyer, J.J. Canary
Mechanism of adrenal atrophy in Cushing's syndrome
due to adrenal tumor.
New England J. Med. 57, 257 (1957).
- 36) Laschet, U.
Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von
Cortison und ACTH auf das Hypophysen- Nebennieren-
rindensystem.
Münch. Med. Wschr. 101, 2053 (1959).
- 37) Laqueur, G.L.
Cytological Changes in Human Hypophyses after Corti-
sone and ACTH Treatment.
Science 112, 429 (1950).
- 38) Liddle, G.W.
Effects of antiinflammatory steroids on electrolyte
metabolism.
Ann. N. Y. Ac. Sc. 82, 854 (1959).
- 39) Montandon, A.
Quantitative und qualitative Zellveränderungen im
Hypophysenvorderlappen bei therapeutischem Hyper-
corticismus.
Virchows Arch. 330, 629 (1957).

- 40) Nelson, D.H., L.T. Samuels
A method for the determination of 17 - hydroxycorticosteroids in blood: 17 - hydroxycorticosterone in the peripheral circulation.
J. Clin. Endocrinol. a. Metab. 12, 519 (1952).
- 41) Nelson, D.H., A.A. Sandberg, J.G. Palmer, F.H. Tyler
Blood levels of 17 - hydroxycorticosteroids following the administration of adrenal steroids and their relation to levels of circulating leukocytes.
J. Clin. Invest. 31, 843 (1952).
- 42) Neustadt, D.H.
Effects of methylprednisolone (medrol) in rheumatoid arthritis. A preliminary study.
Metabolism 7, 497 (1958).
- 43) Pfeffer, K.-H., H.J. Staudinger
Über die Ausscheidung von Corticoiden im Urin unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Klin. Wschr. 30, 257 (1952).
- 44) Pfeffer, K.-H., G.W. Löhr
Die Wirkung von Prednisolon auf die Ausscheidung von 17 - Hydroxycorticoiden und 17 - Ketosteroiden im Harn.
Dtsch. Med. Wschr. 13, 504 (1958).
- 45) Pfeffer K.-H., G. Bublitz
Die Wirkung von Prednison auf die 17 - Hydroxycorticosteroide im Plasma nach ACTH - und Pyrexalgaben.
Klin. Wschr. 38, 657 (1960).
- 46) Raynaud, A., M. Frilley
Développement intra - utérin des embryons de souris dont les ébauches de l'hypophyse ont été détruites, au moyen des rayons X, au 13^e jour de la gestation.
II Développement des capsules surrénales.
C. R. Acad. Sci. 230, 331 (1950).

- 47) Rohrbach, W.
Corticosteroidabbau und Leberfunktion bei Gesunden und Leberkranken.
Inaugural - Dissertation, Med. Fakultät, Freie Universität Berlin (1959).

- 48) Rouso, C., C.V. Perrier
Etude clinique et metabolique d'un nouveau corticostéroïde, la dexaméthasone.
Schweiz. Med. Wschr. 15, 405 (1959).

- 49) Sandberg, H.
Plasma 17 - Hydroxycorticosteroids in Hyperfunction, Suppression, and Deficiency of Adrenal Cortical Function.
J. Laborat. Clin. Med. 50, 286 (1957).

- 50) Sayers, G., M.A. Sayers
Regulation of pituitary adrenocorticotrophic activity during the response of the rat to acute stress.
Endocrinology 40, 265 (1947).

- 51) Slater, J.D.H., P.F. Heffron, A. Vernet, J.D.N. Nabarro
Clinical and metabolic effects of dexamethasone.
The Lancet (1959) I, 173.

- 52) Sutherland, E.W., T.W. Rall
The Relation of Adenosine - 3', 5' - Phosphate and Phosphorylase to the Actions of Catecholamines and other Hormones.
Pharmacological Rev. 12, 265 (1960).

- 53) Tepperman, J., H.M. Tepperman
Some Effects of Hormones on Cells and Cell Constituents.
Pharmacological Rev. 12, 301 (1960).
- 54) Vasama, R., L. Kalliomäki, R. Vasama, E. Näättänen
The adrenal cortex and administration of ACTH, cortisone and combination of ACTH and cortisone.
Ann. med. exp. et biol. fenn. 35, Suppl. I, 5 (1957),
cit. Kongressblatt inn. Medizin 187, 3 : 297 (1958).
- 55) Weißbecker, L.
Wie lange kann eine Cortisonbehandlung ohne hypophysäre Schäden fortgesetzt werden?
Dtsch. Med. Wschr. 84, 47 : 2135 (1959).
- 56) Wells, L.J.
Some Experimental Evidence of Production of Adrenotrophin by the Fetal Hypophysis.
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 68, 487 (1948).
- 57) Wexler, B.C., A.E. Dolgin, E.W. Tryczinski
Effects of a bacterial polysaccharide (Piromen^R) on the pituitary - adrenal axis: Adrenal ascorbic acid, cholesterol and histologic alterations.
Endocrinology 61, 300 (1957).
- 58) Wexler, B.C., A.E. Dolgin, J.F. Zaroslinski, E.W. Tryczinski
Effects of a bacterial polysaccharide (Piromen^R) on the pituitary - adrenal axis: Cortisone blockade of Piromen - induced release of ACTH.
Endocrinology 63, 201 (1958).

Steroid	Anti- inflamm.	Na-Ret.	K-Diur.	KH- u. Eiw.- Stoffw.	Glykogen- abbau	ACTH- Reemie	Halbwert- zeit	Dosis (mg)	
								Aufgabe	Erhal- tung
Cortison	1	1	1	1	1	1		200	50
Cortisol (Hydrocortison)	1—1,25	1,25	1	1,25	1	1,25	52	200 300	50 100
2-Methylcortisol	3	80—100	5—10	4—5	4	—	—	30 50	5 20
16-Methylcortisol	3				2				
Prednison (Dehydrocortison)	3—5	Ø	gering	3—5	3—5	3—5		40 60	10 25
16-Methylprednison	1,1				3—5				
Prednisolon (Dehydrocortisol)	3—5	Ø	gering	3—5	3—5	3—5	71	40	10
9-Fluorprednisolon	14							60	25
6-Methylprednisolon	3—5	Ø	gering	4—6	1—0,3	3—5	81	32 48	8 24
16-Methylprednisolon	12				3				
9-Fluorcortisol	10—15	900 5—1800	10—25	10—15	10	10—15 1		8 12	4 6
2-Methyl-9-fluorcortisol		1000—2000		9					
6-Methyl-9-fluor-Cortisol		250—770							
6-Fluorprednisolon	14	300—	10—25	50	50				
9-Fluor-16-hydroxyprednisolon (Triamcinolon)	3—5	Ø	Ø?	4—6	30	3—5		32 48	8 24
9-Fluor-6-methylprednisolon	24				113!		110		
9-F-6-Methyl-2-desoxycortisol	56				25				
9-Fluor-16-Methylcortisol	36				12				
9-Fluor-16-Methylprednisolon (Dexamethason)	190!	Ø?			17		70	61 6!	2 2
Cortexon = DOC	Ø	30—50	5	Ø	Ø	Ø/?			
Aldosteron	Ø?	300—900	10—25	Ø	Ø	Ø/?			

Tab. 1 , nach W. Beiglböck

" Chemie und Pharmakologie der neuen Kortikosteroide "

(Literaturverzeichnis Nr. 2).

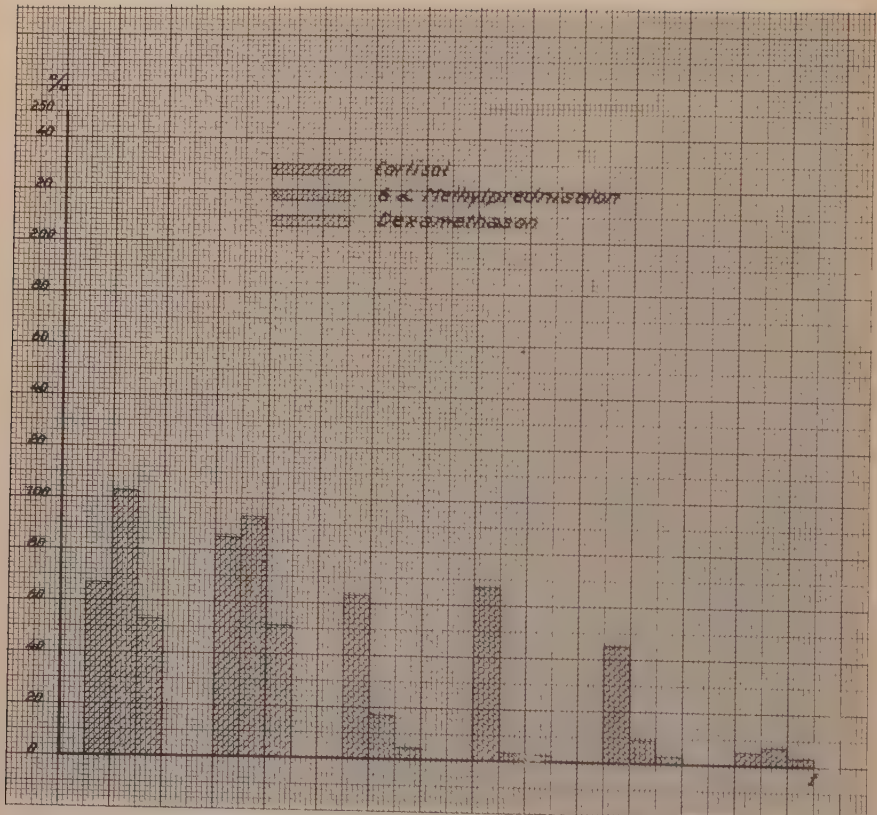


Abb.: 1 17- OHCS im Plasma unter Steroidmedikation.
Darstellung in % vom Ausgangswert, Angabe
der Differenz vom Mittelwert.

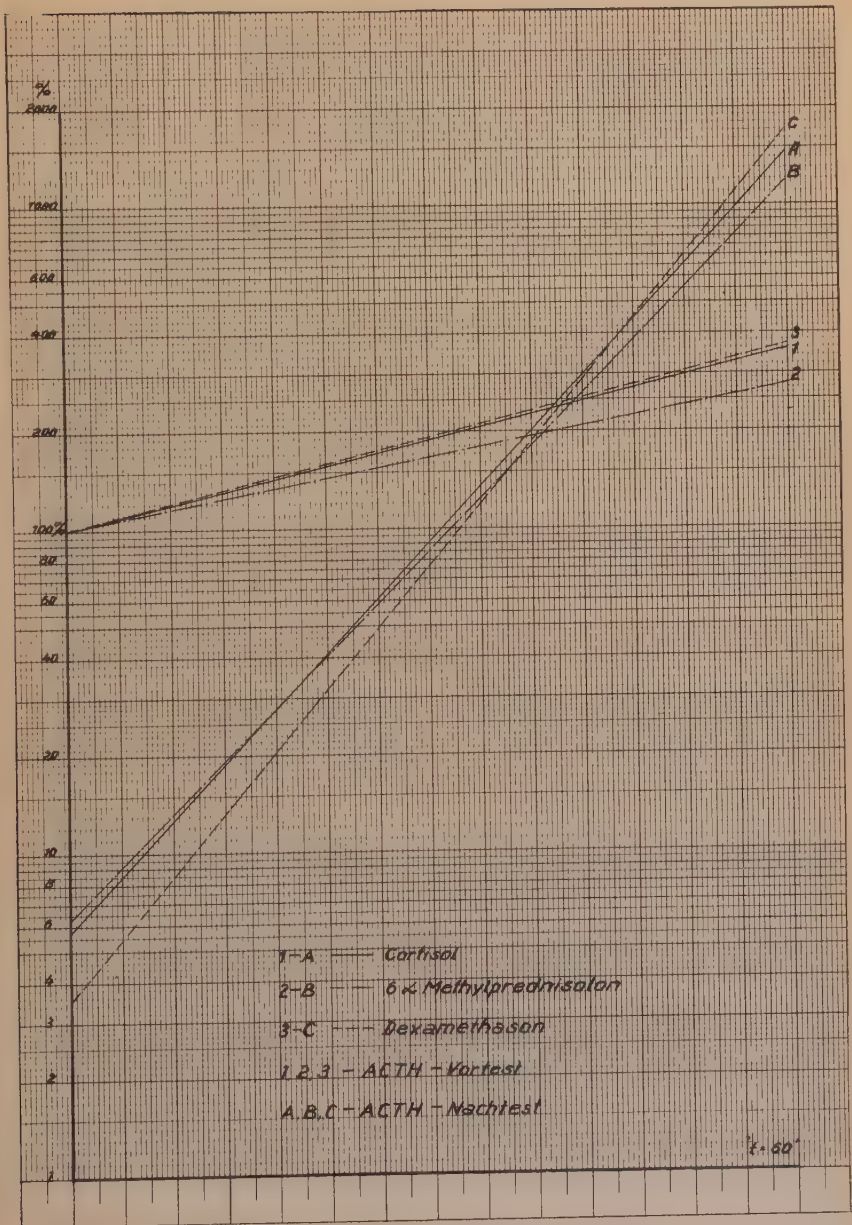


Abb.: 2 Anstieg der 17 - OHCS vor und nach Steroidgabe in %.

Lebenslauf

Am 14.3.1936 wurde ich in Königsberg i.Pr. als Sohn des Ingenieurs Werner Rutsch und seiner Ehefrau Ellinor, geb. Paßlack, geboren.

Nach der 1942 erfolgten Einschulung in Breslau wechselte ich wegen der Kriegs- und Nachkriegswirren oft die Schulen. Das Abitur wurde 1955 in Berlin abgelegt. Mit dem Wintersemester 1955/56 begann mein Medizinstudium an der Freien Universität, Berlin.

Während der Famulatur auf der Inneren Abteilung des Berliner Auguste - Victoria - Krankenhauses 1959 trat ich an Herrn Professor Dr. med. Pfeffer mit der Bitte heran, mir ein Dissertationsthema zu übertragen.

Meinem Wunsche ist entsprochen worden.

Die nötigen Versuche wurden im genannten Krankenhause durchgeführt, sonst die Berliner Bibliotheken benutzt.

Zum Zwecke der Vorbereitung und Ablegung des Staatsexamens im vorigen Jahr mußte ich die Ausarbeitung vorübergehend unterbrechen. Nach den im Herbst 1961 bestandenen Prüfungen, begann ich die Arbeit niederzuschreiben.

Seit dem 1.12.1961 bin ich als Medizinalassistent tätig.

